

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-104033

(43)Date of publication of application : 21.04.1989

(51)Int.Cl.

C07C 83/10  
A61K 31/165  
A61K 31/33  
A61K 31/38  
C07D333/24  
C07D521/00

(21)Application number : 63-187365

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 27.07.1988

(72)Inventor : HASHIMOTO NAOTO  
KATOU KANEYOSHI  
KOZAI YOSHIO

(30)Priority

Priority number : 62189143

Priority date : 29.07.1987

Priority country : JP

## (54) HYDROXAMIC ACID DERIVATIVE

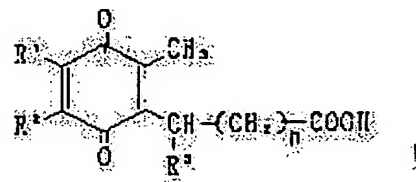
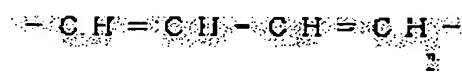
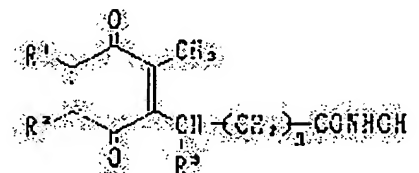
(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A compound of formula I (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> are CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>, or they incorporate to form formula II; R<sup>3</sup> is aromatic or heterocyclic group which may be substituted; n is 5 or 6).

EXAMPLE: 7-(4-Methoxyphenyl)-7-(3,5,6-trimethyl-1,4-benzoquinon-2-yl)-heptanohydroxamic acid.

USE: Medicine. It is used to suppress the rejection after transplant of organs, or as a remedy or prophylactic for cancer and self-immune diseases. Further, it has actions to inhibit cell proliferation and new formation of blood vessels, moreover action to inhibit the formation of 5-lipoxygenase metabolites and used as an antiasthmatic, antiallergic or cerebral circulation improver with extremely reduced toxicity and side-effects.

PREPARATION: A compound of formula III is allowed to react with an agent for activating carboxylic acid such as oxalyl chloride in a solvent and the product is allowed to react with hydroxylamine in a solvent to give the compound of formula I.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-104033

⑪ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)4月21日

C 07 C 83/10  
A 61 K 31/165  
31/33  
31/38  
C 07 D 333/24  
521/00

ADU  
ABC  
ADS

6785-4H

7822-4C

7822-4C 審査請求 未請求 請求項の数 5 (全7頁)

⑭ 発明の名称 ヒドロキサム酸誘導体

⑮ 特 願 昭63-187365

⑯ 出 願 昭63(1988)7月27日

優先権主張 ⑰ 昭62(1987)7月29日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭62-189143

⑳ 発 明 者 橋 本 直 人 大阪府吹田市津雲台4丁目4番15号  
㉑ 発 明 者 加 藤 金 芳 大阪府吹田市新芦屋上17番H-407号  
㉒ 発 明 者 香 西 義 雄 大阪府豊中市清風荘1丁目9番5号  
㉓ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市東区道修町2丁目27番地  
㉔ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘

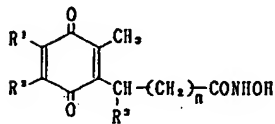
明 細 書

1. 発明の名称

ヒドロキサム酸誘導体

2. 特許請求の範囲

1. 一般式



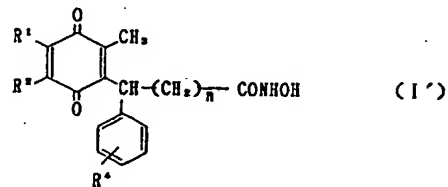
(I)

(式中、R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>は同一または異なってメチル基またはメトキシ基を示すか、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>が互いに結合しR<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>で-CH=CH-CH=CH-を示す。R<sup>3</sup>は置換されていてもよい芳香族基または異項環基を、nは5または6を示す。)で表わされるヒドロキサム酸誘導体。

2. 一般式(I)中、nが5である請求項1記載のヒドロキサム酸誘導体。

3. 一般式(I)中R<sup>3</sup>がメチルで置換されていてもよいチエニル基である請求項1記載のヒドロキサム酸誘導体。

4. 一般式



(I')

(式中R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>およびnは前記と同意義であり、R<sup>3</sup>は水素原子、メチル基、メトキシ基、塩素原子またはフッ素原子を示す。)で表わされる請求項1記載のヒドロキサム酸誘導体。

5. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>がメチル基でR<sup>3</sup>が水素原子である請求項4記載のヒドロキサム酸誘導体。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、細胞増殖抑制作用、血管新生抑制作用を有し、癌または自己免疫疾患の治療および予防作用を有する新規なヒドロキサム酸誘導体に関するものである。

[従来技術]

細胞増殖は生物が成長あるいは生命を維持していくうえで欠くことの出来ない機能である。高等動物では多くの組織や臓器が各々独自の増殖機構を有しており、それらは様々な制御機構によって調節されている。近年、生体内から数10種類の細胞増殖を正に制御する物質、即ち“細胞増殖因子”が分離、精製されつつあり、個体の形成、維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。一方、細胞増殖の異常、特に制御を外れた無制限の増殖が各種の疾患と関係しているとの報告も多い。例えば、ガンはその典型といえる。またガン細胞は増殖を維持していくために、血管の新生を促進させる物質を放出して、ガン組織周辺やその内部に脈管を形成させることが分かっているが、この因子(血管新生因子)が血管内皮細胞に対して強力な増殖促進活性を持つことが明らかにされつつある。またこのような血管新生は慢性炎症、糖尿病性網膜症、乾せん、リウマチ性関節炎等の病態時にも認められ、これらの疾患の進展に対する関与が示唆されている。

(式中、 $R^1, R^2$ は同一または異なってメチル基またはメトキシ基を示すか、 $R^1$ と $R^2$ が互いに結合し $R^1$ と $R^2$ で $-CH=CH-CH=CH-$ を示す。 $R^3$ は置換されていてもよい芳香族基または異項環基を、 $n$ は5または6を示す。)で表わされるヒドロキサム酸誘導体である。

前記一般式(I)中、 $R^3$ で示される芳香族基としてはたとえばフェニル基、ナフチル基、インゲニル基(4-インゲニル、5-インゲニル)などのアリール基があげられ、異項環基としては酸素原子、窒素原子および硫黄原子の少なくとも一個を環構成原子として含有する5または6員環の単環性化合物または二環性化合物があげられその具体例としては、たとえばチエニル基(2-チエニル、3-チエニル)、フリール基(2-フリール、3-フリール)、ピリジル基(2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル)、キノリル基(4-キノリル、8-キノリル)、イソキノリル(4-イソキノリル、8-イソキノリル)などがあげられる。なかでもフェニル、

また、免疫担当細胞特にリンパ球の活性化にも種々の細胞増殖因子が関与していることが分かってきており、自己免疫疾患あるいはアレルギー疾患の増悪因子の一つとして、これら細胞増殖因子の過剰産生や過剰応答が考えられている。従って、上記疾患に関与している細胞増殖因子に対して選択的に阻害したり、応答を抑制する薬物が開発されれば、これらの疾患に対して有効な予防、治療手段となりうるし、臓器移植時の拒否反応の抑制にも有効と思われる。

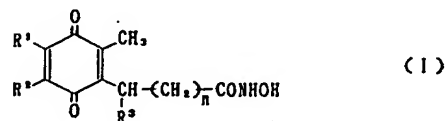
[発明が解決しようとする課題]

本発明は細胞増殖抑制作用を有する新規なヒドロキサム酸誘導体を提供するものである。

[課題を解決するための手段]

本発明は、

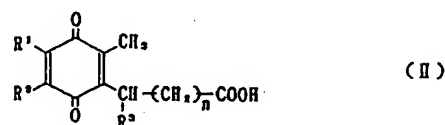
一般式



チエニルが好ましい。これら芳香族基および異項環基は環上の任意の位置に1~5個、好ましくは1~3個の置換基を有していてもよく、このような置換基としてはたとえばフッ素、塩素、臭素などのハロゲン原子、メチル、エチル、プロピルなど炭素数1~3のアルキル基、メトキシ、エトキシ、プロポキシなど炭素数1~3のアルコキシ基などがあげられる。

一般式(I)で表わされる化合物は

一般式



(式中、各記号は前記と同意義である)で表わされる化合物にカルボン酸活性化剤を反応させてカルボキシル基における反応性誘導体へ導ききついでこれにヒドロキシルアミンを反応させることによって製造することができる。

化合物(II)とカルボン酸活性化剤の反応におい

て、カルボン酸活性化剤としてはたとえばチオニルクロライド、五塩化リン、クロル炭酸エステル(クロル炭酸メチル、クロル炭酸エチル)、オキザリルクロライド、カルボジイミド類(例、N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC))などがあるが、カルボジイミド類とパラニトロフェノールまたはヒドロキシコハク酸イミドを併用してもよい。この反応は通常たとえば塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、イソプロピルエーテルなどのエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミドまたはこれらの混合溶媒などの存在下におこなわれる。反応温度は通常-10℃~50℃である。

この反応において、カルボン酸活性化剤として塩化チオニル、オキザリルクロライドまたは五塩化リンを用いた場合は反応性誘導体として酸ハライドが得られ、カルボン酸活性化剤としてクロル炭酸エステルを用いた場合には反応性誘導体として混合酸無水物が得られ、またカルボン酸活性化

剤としてカルボジイミド類を用いた場合には反応性誘導体として活性エステルが得られる。

化合物(II)のカルボキシル基における反応性誘導体とヒドロキシルアミンとの反応は、該反応性誘導体が酸ハライドである場合はたとえばジクロルメタン、テトラヒドロフラン、アセトンなどの溶媒中、脱酸剤(ピリジン、トリエチルアミン、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウムなど)の存在下に無水または含水条件下に行なわれる。反応温度は-10℃~30℃程度である。該反応性誘導体が活性エステルまたは混合酸無水物である場合は化合物(II)とカルボン酸活性化剤との反応で用いた溶媒と同様な溶媒中に行なうことができる。この場合の反応温度は通常0~30℃で反応時間は1~5時間である。

かくして製造されるヒドロキサム酸誘導体(I)は、自体公知の分離、精製手段(例、クロマトグラフィ、結晶化法)などにより単離採取することができる。

ヒドロキサム酸誘導体(I)は、構造上キノン核側鎖アルファ(α)炭素において不斉中心をもつため光学活性を有する化合物が存在する。従って本発明化合物(I)は光学活性化合物およびラセミ化合物のいずれも含むことを意味する。

本発明の化合物は各種細胞(内皮細胞、リンパ球、ガン細胞など)の増殖抑制作用を有し、そのため、血管新生抑制作用、免疫抑制作用、ガン細胞増殖抑制作用を有する。しかも毒性、副作用は極めて低い。したがって本発明の化合物(I)は哺乳動物(マウス、ラット、ウサギ、サル、馬、人など)に対して糖尿病性網膜症、乾せん、リウマチ、慢性炎症、自己免疫疾患、痛などの諸疾患の治療および予防剤として有用である。また臓器移植時における拒否反応の抑制剤としても有用である。

さらに、本発明化合物(I)は、多価不飽和脂肪酸(リノール酸、γ-リノレン酸、α-リノレン酸、アラキドン酸、ジホモγ-リノレン酸、エイコサペンタエン酸)の代謝改善、特に過酸化脂肪酸の生成抑制作用(抗酸化作用)あるいは5-リボキシ

ゲナーゼ系代謝産物(例、ロイコトリエン類、5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸、5-パーオキシエイコサテトラエン酸、リボキシン類など)の生成抑制作用も有しており、哺乳動物に対して気管支喘息、炎症、即時性アレルギー、動脈硬化、アテローム変性動脈硬化、脂肪肝、肝炎、肝硬変、過敏症肺臓炎などの諸疾患に対して治療および予防効果が期待され、たとえば抗喘息剤、抗アレルギー剤、脳循環系改善剤、冠状動脈硬化予防剤、免疫調整剤、プロスタグランジンシントロンボキサン代謝改善剤、脂肪肝、肝炎、肝硬変、過敏症肺臓炎治療剤などの医薬として有用である。

本発明化合物は毒性が低く、そのままもしくは自体公知の薬学的に許容される担体、賦形剤などと混合した医薬組成物[例、錠剤、カプセル剤(ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む)、液剤、注射剤、坐剤]として経口的もしくは非経口的に安全に投与することができる。投与量は投与対象、投与ルート、症状などによっても異なるが、たとえば、成人には1日当り通常約0.1mg/kg~40mg/

kg体重程度、好ましくは0.2mg/kg～20mg/kg体重程度である。

化合物(II)はたとえば特開昭61-44840に記載の方法によって製造することができる。

#### [発明の効果]

本発明に係る新規ヒドロキサム酸誘導体は細胞増殖抑制作用を有し、血管の新生を阻止し、癌細胞の増殖を抑制し、免疫を抑制するため、制癌剤として用いられるほか、臓器移植時における拒否反応を抑制するために用いることができる。

#### [実施例]

##### 実施例1

7-(4-メトキシフェニル)-7-(3,5,6-トリメチル-1,4-ベンゾキノン-2-イル)-ヘプタン酸(1.3g, 3.3mmol)をジクロルメタン(20ml)に溶かし、オキサリルクロライド(1ml)を室温にて加えた。反応液を50℃で1時間撹拌した後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残留物をTHF(5ml)に溶かし、ヒドロキシルアミン塩酸塩(1g, 14mmol)のTHF(10ml)と

飽和重曹水(10ml)の混合液に室温下で滴下した。

室温にて1時間撹拌後反応液に酢酸エチル(20ml)を加えた。有機層を水洗、乾燥後、減圧濃縮して7-(4-メトキシフェニル)-7-(3,5,6-トリメチル-1,4-ベンゾキノン-2-イル)-ヘプタンヒドロキサム酸(0.6g, 42%)を得た。物性は第1表に化合物No.4として記載した。同様にして第1表中の化合物No.6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16および17を製造した。







##### 実施例2

7-(4-フルオロフェニル)-7-(3,5,6-トリメチル-1,4-ベンゾキノン-2-イル)-ヘプタン酸(0.8g, 2.2mmol)をジクロルメタン(20ml)に溶かし、オキサリルクロライド(0.5ml)を室温にて加えた。反応液を50℃で1時間撹拌した後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残留物をTHF(5ml)に溶かし、ヒドロキシルアミン塩酸塩(0.5g, 7mmol)のTHF(10ml)と飽和重曹水(10ml)の混合液に室温下で滴

下した。室温にて1時間撹拌後反応液に酢酸エチル(20ml)を加えた。有機層を水洗、乾燥後、減圧濃縮し、残留物をイソプロピルエーテルから再結晶して7-(4-フルオロフェニル)-7-(3,5,6-トリメチル-1,4-ベンゾキノン-2-イル)-ヘプタンヒドロキサム酸(0.7g, 85%)を得た。物性は第1表に化合物No.2として記載した。同様にして第1表中の化合物No.1,3および5を製造した。

(以下余白)

第1表 化合物(1)

化合物番号	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	組成式 融点(℃)	NMRスペクトル(CDCl <sub>3</sub> 中), δ(ppm)
1	Me	Me		5	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> NO, 60-61	1.1-1.8(4H,m), 2.0-2.4(4H,m), 1.97(6H,s), 2.02(3H,s), 4.27(1H,t,7Hz), 7.22(5H,m)
2	Me	Me		5	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> NO,F 97-98	1.1-1.8(6H,m), 2.0-2.4(4H,m), 1.95(6H,s), 2.04(3H,s), 4.21(1H,t,7Hz), 6.94(3H,m), 7.26(2H,m)
3	Me	Me		5	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO, 69-70	1.1-1.8(6H,m), 2.0-2.4(4H,m), 1.95(6H,s), 2.02(3H,s), 2.27(3H,s), 4.21(1H,t,7Hz), 7.09(4H,m)
4	Me	Me		5	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H,m), 2.0-2.4(4H,m), 1.97(6H,s), 2.04(3H,s), 3.75(3H,s), 4.18(1H,t,7Hz), 6.78(2H,d,8Hz), 7.20(2H,d,8Hz)
5	Me	Me		5	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO,CF <sub>3</sub> 58-59	1.1-1.8(6H,m), 2.0-2.4(4H,m), 2.00(6H,s), 2.05(3H,s), 4.20(1H,t,7Hz), 7.23(4H,m)
6	Me	Me		6	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H,m), 2.0-2.4(4H,m), 1.99(6H,s), 2.04(3H,s), 4.03(1H,t,7Hz), 7.27(5H,m)

第1表(つづき)

化合物 番号	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	組成式 融点(°C)	NMRスペクトル(CDCl <sub>3</sub> 中), δ(ppm)
7				5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, F oil	1.1-1.8(6H, m), 2.0-2.4(4H, m), 2.17(3H, s), 4.37(1H, t, 7Hz), 6.95(2H, m), 7.27(2H, m), 7.65(2H, m), 7.99(2H, m)
8				5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H, m), 2.0-2.4(4H, m), 2.19(3H, s), 4.40(1H, t, 7Hz), 7.24(5H, m)
9	MeO	MeO		5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H, m), 2.0-2.4(4H, m), 2.01(3H, s), 3.95(6H, s), 4.27(1H, t, 7Hz), 7.23(5H, m)
10				5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H, m), 1.9-2.5(4H, m), 2.19(3H, s), 4.37(1H, t, 7Hz), 7.03(3H, m), 7.64(2H, m), 8.01(2H, m)
11	Me	Me		5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H, m), 1.9-2.4(4H, m), 1.98(6H, s), 2.03(3H, s), 4.23(1H, t, 7Hz), 7.05(4H, m)
12	Me	Me		6	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(10H, m), 1.9-2.4(4H, m), 1.98(6H, s), 2.03(3H, s), 4.23(1H, t, 7Hz), 7.05(4H, m)

## 実施例 3

## 製剤例

## A) カプセル

- |                  |      |
|------------------|------|
| (1) 化合物No. 1     | 50mg |
| (2) 微粉末セルロース     | 30mg |
| (3) ラクトース        | 37mg |
| (4) ステアリン酸マグネシウム | 3mg  |

計 120mg

(1), (2), (3)および(4)を混合してゼラチンカプセルに充填した。

## B) 軟カプセル

- |              |       |
|--------------|-------|
| (1) 化合物No. 7 | 50mg  |
| (2) トウモロコシ油  | 100mg |

計 150mg

## C) 錠剤

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| (1) 化合物No. 2      | 50mg   |
| (2) ラクトース         | 34mg   |
| (3) トウモロコシ澱粉      | 10.6mg |
| (4) トウモロコシ澱粉(のり状) | 5mg    |
| (5) ステアリン酸マグネシウム  | 0.4mg  |

第1表(つづき)

化合物 番号	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	組成式 融点(°C)	NMRスペクトル(CDCl <sub>3</sub> 中), δ(ppm)
13	Me	Me		5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H, m), 1.9-2.5(4H, m), 1.98(6H, s), 2.03(3H, s), 2.19(6H, s), 4.20(1H, t, 8Hz), 6.95(3H, m)
14				5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(4H, m), 1.9-2.4(4H, m), 2.20(3H, s), 3.84(6H, s), 4.37(1H, t, 7Hz), 6.83(3H, m), 7.66(3H, m), 8.03(2H, m)
15				5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, S oil	1.1-1.8(4H, m), 1.9-2.4(4H, m), 2.21(3H, s), 2.37(3H, s), 4.52(1H, t, 7Hz), 6.52(1H, d, 3 Hz), 6.67(1H, d, 3Hz), 7.67(2H, m), 8.05(2H, m)
16	Me	Me		5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H, m), 1.81(3H, s), 2.0-2.4(4H, m), 1.97(3H, s), 2.03(3H, s), 5.05(1H, t, 7Hz), 7.2-7.8(7H, m)
17	Me	Me		5	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO, oil	1.1-1.8(6H, m), 2.96(6H, s), 2.01(3H, s), 2.83(4H, m), 4.21(1H, t, 7Hz), 7.15(3H, m)

## (6) カルボキシメチルセルロースカルシウム

20mg

計 120mg

常法に従ってこれらを混合して錠剤機により打錠した。

実験例 1 (モルモット多形核白血球由来の 5-リボキシゲナーゼに対する阻害作用(10<sup>-6</sup>M))

5-リボキシゲナーゼは、モルモット腹腔白血球より得た酵素標品を用いた。リボキシゲナーゼ活性測定には 25 μM [1-<sup>14</sup>C]アラキドン酸(5 × 10<sup>4</sup>cpm)を基質として、50 mM リン酸緩衝液(pH 7.4), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP および酵素を含む反応液(200 μl)を用いた。25℃で、2分間ブレインキュベートした後、[1-<sup>14</sup>C]アラキドン酸(5 × 10<sup>4</sup>cpm)を添加し、25℃で3分間反応後、その反応液を酸性にし、アラキドン酸および代謝産物をエーテルで抽出した。エーテル層の放射活性はシリカゲル薄層クロマトグラフィで石油エーテル:エチルエーテル:酢酸(15:85:0.1)の展開溶媒を用い、-10℃で

展開した。展開後、薄層プレートのオートラジオグラフィーをとった後、薄層プレートから放射性部位のシリカゲルをかき取り、生成物の放射性を計数した。薬物は反応開始2分前に添加した。

化合物番号	阻害活性(%)
1	74.6
2	79.3
4	83.8
7	89.7

実験例2 (血小板膜画分とU-46619(PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>)の結合阻害反応)

モルモットの採血および血小板膜画分の調製は、エス・シー・ハング(S.C.Hung)らの方法[Biochim. Biophys. Acta, 728, 171-178(1983)]に準じて行なった。ハートレー(Hartle)系モルモットをエーテル麻酔下、心臓から採血し、3.15%クエン酸ナトリウム液(最終濃度1mMアスピリン含有)に懸濁した(クエン酸ナトリウム液:全血=1:9)。クエン酸ナトリウム加血液を3000rpm、5-6秒間遠心し、platelet rich plasma(PRP)を

分離した。PRPをさらに4800rpm、10分間4℃で遠心し、血小板ペレットを得た。血小板ペレットは30mlの25mM Tris-HCl緩衝液(5mM MgCl<sub>2</sub>含有, pH 7.4)で洗浄し、同じ緩衝液で懸濁し、血小板はsonicatorを用いて、破壊した後、10000rpmで1hr遠心し、膜画分を緩衝液で懸濁した。蛋白定量はBiorad protein assay キットを用いて行ない、1-1.5mg/ml蛋白に調製した。

Binding assay は次の方法で行なった。 [<sup>3</sup>H] U-46619 4nM、薬液10<sup>-8</sup>-10<sup>-10</sup>Mおよび血小板膜画分100μg蛋白からなる反応液を25℃(室温)で30分インキュベートした。反応液はグラスフィルター(GF/C)でろ過し、上記緩衝液で2回洗浄し、グラスフィルターを液体シンチレーター(アニオン系)4mlに入れ、放射能活性を測定した。

化合物番号	IC <sub>50</sub> (M)
4	6.0
7	2.6

実験例3 (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の細胞増殖阻害の検定)

ヒト血管内皮細胞はヒト臍帯静脈より、トリプシン酵素溶液による濾流法により得られ、GIT培地(大五栄養化学)に、2.5%ウシ胎児血清および2.0ng/mlのヒト組み替え線維芽細胞増殖因子(以下、rFGFと略す。当社生物工学研究所において作製)を添加した培養液にて継代維持されたものを使用した。

2×10<sup>3</sup>個のヒト血管内皮細胞の懸濁液、100μlを、96穴培養皿(Nunc, 1-67008)に播種し、ガス制御恒温槽で培養する。翌日、終濃度2ng/mlになるようなrFGFと、種々の濃度の検体を含む培地、100μlを加えた。検体はジメチルスルホキシド(以下、DMSO)溶液に溶解し、DMSO終濃度が0.25%以下になるように培養液にて希釈した。3日間培養の後、検体を含む培養液を吸引除去し、1mg/mlのMTT溶液(3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロマイ

ドを培養液に溶解)を100μl加え、4時間保温した。その後、100μlの10%SDS溶液(ソジウムドデシルスルフェート水溶液)を加えて5-6時間保温して、細胞およびMTT色素を可溶化し、分光光度計にてOD<sub>550</sub>値を測定した。検体を加えない対照群のOD値を100%とし、50%のOD値を与える化合物濃度、IC<sub>50</sub>値により各検体の、内皮細胞増殖阻害活性を比較検討した。

化合物番号	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
1	0.63
2	1.25
3	1.25
4	0.63
5	1.25
6	25
7	<0.63
8	<0.63
9	1.25

実験例4 (IL-2依存性細胞(NKC-3)の細胞増殖阻害の検定)



96穴平底マイクロプレートの各穴にNK C-3細胞( $4 \times 10^3$ 個/穴)を50 $\mu$ l、IL-2溶液(0.067 U/ml)を20 $\mu$ l、更に検体(DMSO溶液)を40 $\mu$ l入れ、37℃で20時間培養した(培養液: RPMI 1640-20% ECS)。各穴にMTT溶液20 $\mu$ lを加え、37℃で4時間保温した。続いて各穴に10% SDS溶液100 $\mu$ lを加え、37℃で一晩放置して、細胞およびMTT色素を可溶化し、分光光度計にて590 nmの吸光度を測定した。検体を加えない場合の吸光度を100として、50%吸光度を与える化合物濃度をIC<sub>50</sub>値とした。

化合物番号	IC <sub>50</sub> (M)
1	$4.1 \times 10^{-5}$

実験例5 (ニワトリ胚漿尿膜法による血管新生抑制活性アッセイ法)

培養ニワトリ胚漿尿膜を使用する血管新生抑制活性のアッセイ法は、テイラーらの方法の変法を用いて評価した〔テイラーほか、S. Taylor & J. Polkman, Nature, 297, 307(1982)〕。3日齢の

薬物投与開始後4日間の観察機関中、死亡例はなく、体重減少等の異状は観察されなかった。

代理人 弁理士 岩 田 弘

有精卵の殻を除去して培養し、10(または11)日齢に達した胚を使用した。血管新生物質であるECS(endothelial cell growth supplement、コラボレイチブ リサーチ社)とともに検体(100 $\mu$ g)の水溶液または水懸濁液を透明プラスチック製ディスク上で乾固し、漿尿膜上に付置し、2(または3)日後に実体顕微鏡下に血管新生の有無をコントロールと比較して判定した。

化合物番号	有 効 性
4	+
5	+
7	+
8	+

#### 実験例6

各群5匹ずつの雄性ICRマウス(8週齢)を使用した。3日間検体(化合物番号1)

100 mg/kg/day を皮下投与した。投与液は0.5%アラビアゴムを含む生理食塩水に溶解し100 mg/10 ml/kg体重で投与した。

[結果]